

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表平10-510249

(43) 公表日 平成10年(1998)10月6日

(51) Int.Cl.<sup>6</sup>  
A 6 1 K 38/00  
31/70  
39/395  
C 0 7 C 291/08  
C 0 7 H 21/02

識別記号  
ABN  
AED

F I  
A 6 1 K 37/02  
31/70  
39/395  
C 0 7 C 291/08  
C 0 7 H 21/02

ABN  
AED  
A

審査請求 有 予備審査請求 有 (全 48 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平8-517048  
(86) (22) 出願日 平成7年(1995)11月20日  
(85) 翻訳文提出日 平成9年(1997)5月22日  
(86) 國際出願番号 PCT/US95/15180  
(87) 國際公開番号 WO96/15797  
(87) 國際公開日 平成8年(1996)5月30日  
(31) 優先権主張番号 08/344, 157  
(32) 優先日 1994年11月22日  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 アメリカ合衆国  
アメリカ合衆国、メリーランド州 20892  
-9902、ベセスダ、ナショナル インステ  
ィテューツ オヴ ヘルス、オフィス オ  
ヴ テクノロジー トランシスファー、ボッ  
クス オーティーティー (番地なし)  
(72) 発明者 サーヴィドラ、ジョセフ イー。  
アメリカ合衆国、メリーランド州 21788、  
サーモント、ブラウンズ レーン、7189  
(72) 発明者 キーファー、ラリー ケイ。  
アメリカ合衆国、メリーランド州 29817、  
ベセスダ、リヴァー ロード、7016  
(74) 代理人 弁理士 高島 一

最終頁に続く

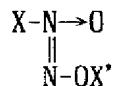
(54) 【発明の名称】 酸化窒素放出生体高分子含有医薬組成物

(57) 【要約】

ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、あるいは核酸等の生体高分子を含有し、これに酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が結合した、生理学的条件下での酸化窒素放出が可能な高分子組成物；該高分子組成物を含有する医薬組成物；酸化窒素の投与が治療となる生物学的障害の治疗方法。

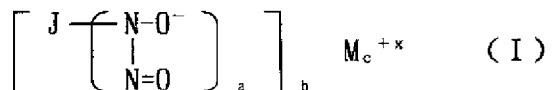
## 【特許請求の範囲】

1. 生体高分子および該生体高分子に結合した酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基とを含有する、生理学的条件下での酸化窒素放出が可能な高分子組成物。
2. 該生体高分子が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、および核酸からなる群より選択される請求の範囲第1項の高分子組成物。
3. 該生体高分子が、組織、細胞、あるいは腫瘍特異的な抗体またはその断片、腫瘍細胞接着に好適な受容体-リガンド相互作用の認識配列を有するタンパク質、抗走化性剤およびホルモンからなる群より選択される請求の範囲第2項の高分子組成物。
4. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式：



(式中、Xは有機または無機部位であり、X'はX、医薬的に許容しうる金属中心あるいは医薬的に許容しうるカチオンからなる群より選択される)であり、該  $N_2O_2^-$  基がXあるいはX'の少なくとも一方を介して生体高分子に結合している請求の範囲第1項の高分子組成物。

5. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式：

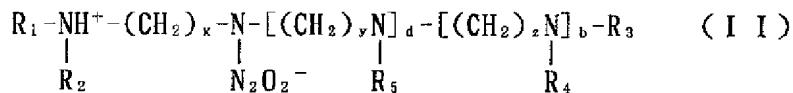


(式中、Jは有機または無機部位であり、 $M_c^{+*}$ は医薬上許容されるカチオン(式中、\*はカチオンの原子価である)であり、aは少なくとも1の整数であり、bおよびcは中性化合物を与える最も小さい整数である。)である請求の範囲第4項の高分子組成物。

6. Jが、炭素原子以外の原子を介して複合体の残りの部分の窒素に結合している請求の範囲第5項の方法。

7. 該酸化窒素放出基がアラノシンあるいはドパスチンの塩以外の化合物である請求の範囲第5項の高分子組成物。

8. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式：

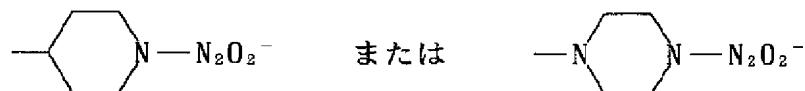


(式中、b および d は同一または異なって 0 または 1 であり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub> および R<sub>5</sub> は同一または異なるて水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは 2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、x、y および z は同一または異なるて 2 ~ 12 の整数である。) である請求の範囲第4項の高分子組成物。

9. 該酸化窒素放出 N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が式：

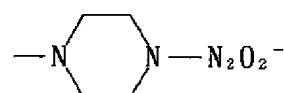


(式中、B は



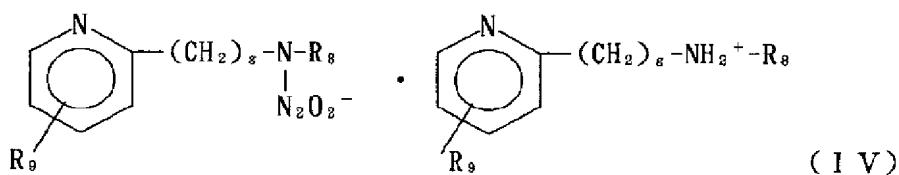
であり、R<sub>6</sub> および R<sub>7</sub> は同一または異なるて水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、

トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは 2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、f は 0 ~ 12 の整数であり、ただし B が置換されたピペラジン部位



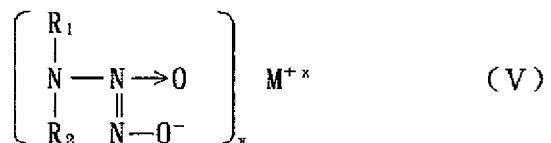
の場合、f は 2 ~ 12 の整数である。) である請求の範囲第4項に記載の高分子組成物。

10. 該酸化窒素放出 N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が式：



(式中、 $R_8$ は水素、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-12}$ 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、 $R_9$ は水素または $C_{1-C_{12}}$ 直鎖または分枝鎖アルキルであり、 $g$ は2~6である。)である請求の範囲第4項の高分子組成物。

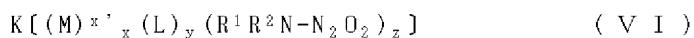
1 1 . 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



(式中、 $R_1$ および $R_2$ は独立して $C_{1-C_{12}}$ 直鎖または分枝鎖アルキル基およびベンジル基からなる群より選ばれ、あるいは $R_1$ および $R_2$ が窒素原子と共に

結合して、複素環基、ピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を形成し、 $M^{+*}$ は医薬上許容されるカチオンであり、 $x$ はカチオンの原子価である。)である請求の範囲第4項の高分子組成物。

1 2 . 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



(式中、 $M$ は医薬上許容される金属、または $x$ が少なくとも2の場合、異なる2種の医薬上許容される金属の混合物であり、 $L$ は $(R^1 R^2 N - N_2 O_2)$ とは異なる配位子であり、少なくとも1つの金属に結合しており、 $R^1$ および $R^2$ はそれぞれ有機部位であり、それらは同一または異なっていてよく、 $x$ は1~10の整数であり、 $x'$ は金属 $M$ の形式的な酸化状態を示し、1~6の整数であり、 $y$ は1~18の整数であり、ただし、 $y$ が少なくとも2の場合、配位子 $L$ は同一または異なっていてもよく、 $z$ は1~20の整数であり、 $K$ は化合物を必要な程度まで

中性にする医薬上許容される対イオンである。) である請求の範囲第4項の高分子組成物。

13. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式 :



(式中、RはC<sub>2-8</sub>低級アルキル、フェニル、ベンジルまたはC<sub>3-8</sub>シクロアルキルであり、R基のいかなるものも1~3個の置換基で置換されていてもよく、その置換基は同一または異なっていて、ハロゲン、ヒドロキシ、C<sub>1-8</sub>アルコキシ、-NH<sub>2</sub>、-C(O)NH<sub>2</sub>、-CH(O)、-C(O)OHおよび-NO<sub>2</sub>からなる群より選ばれ、Xは医薬上許容されるカチオン、医薬上許容される金属中心、またはC<sub>1-8</sub>低級アルキル、-C(O)CH<sub>3</sub>および-C(O)NH<sub>2</sub>からなる群より選ばれる医薬上許容される有機基であり、yは1~3の整数であり、

Xの原子価と一致する。) である請求の範囲第4項の高分子組成物。

14. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式 :



(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は独立して、C<sub>1-12</sub>直鎖アルキル、アルコキシまたはアシルオキシで置換されたC<sub>1-12</sub>直鎖アルキル、ヒドロキシまたはハロゲン置換されたC<sub>2-12</sub>直鎖アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、ヒドロキシ、ハロゲン、アルコキシまたはアシルオキシで置換されたC<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはヒドロキシ、アルコキシ、アシルオキシ、ハロゲンまたはベンジルで置換されているC<sub>3-12</sub>直鎖または分枝鎖オレフィンから選ばれるか、あるいはR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>がそれらが結合している窒素原子と共に複素環基、ピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を形成し、R<sub>3</sub>は、置換されていないか、またはヒドロキシ、ハロゲン、アシルオキシまたはアルコキシで置換されているC<sub>1-12</sub>直鎖およびC<sub>2-12</sub>分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはハロゲン、アルコキシ、アシルオキシまたはヒドロキシで置換されているC<sub>3-12</sub>直鎖またはC<sub>3-12</sub>分枝鎖オレフィン、置換されていないかまたは置換されているC<sub>1-12</sub>アシル、スルホニルおよびカルボキサミドから選ばれる基、あるいはR<sub>3</sub>は式一

$(C_2H_5)_n - O - N = N - (O) - N - R_1 - R_2$  (式中、 $n$  は 2 ~ 8 の整数であり、 $R_1$  および  $R_2$  は上記に定義した通り) であり、ただし、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  はヘテロ原子の  $\alpha$  にハロゲンまたはヒドロキシ置換基を含まない。] である請求の範囲第 4 項の高分子組成物。

15. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 1 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

16. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 2 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

17. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 3 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

18. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 4 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

19. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 5 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

20. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 6 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

21. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 7 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

22. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 8 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

23. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 9 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

24. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 10 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

25. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 11 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

26. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 12 項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

27. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第1項の高分子組成物を哺乳類に投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

28. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第2項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

29. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第3項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

30. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第4項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

31. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第5項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

32. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第6項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

33. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第7項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

34. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第8項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

35. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第9項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

36. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第10項の高

分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

37. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第11項の高分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

38. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量で請求の範囲第12項の高

分子組成物を投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害を治療する方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 酸化窒素放出生体高分子含有医薬組成物

## 発明の技術分野

本発明は、酸化窒素放出が可能な高分子組成物に関する。特に本発明は、酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が結合している、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸等の生体高分子を含有する高分子組成物、該高分子組成物を含有する医薬組成物、および該生体高分子組成物によって生物学的障害を治療する方法に関する。

## 発明の背景

酸化窒素（NO）は近年、血圧の正常な生理学的制御、マクロファージ誘導性の細胞性塞栓や細胞毒性、ならびに神経伝達を含め多様な生体制御過程に関与するようになった（Moncada et al., 「L-アルギニン由来の酸化窒素：生体制御系」（“Nitric Oxide from L-Arginine: A Bioregulatory System”），Excerpta Medica, International Congress Series 897(Elsevier Science Publishers B.V.: Amsterdam, 1990); Marletta et al., 「酸化窒素の生物学的意義の解明」（“Unraveling the Biological Significance of Nitric Oxide”），Biofactors，2, 219-225(1990); Ignarro, 「酸化窒素 細胞を介した伝達の為の新しいシグナルトランスダクションの機構」（“Nitric Oxide. A Novel Signal Transduction Mechanism for Transcellular Communication”），Hypertension(Dallas)，16, 477-483(1990)）。代謝されて酸化窒素を放出する化合物および水溶液中で自発的に酸化窒素を放出する化合物を含めた、酸化窒素を送達することのできる多数の化合物が開発されている。

代謝されて酸化窒素を放出するそれらの化合物には、広く使用されているニトロ血管拡張剤、三硝酸グリセリンおよびニトロフルシドナトリウムが含まれる

(Ignarro et al., J.Pharmacol. Exp. Ther., 218, 739-749(1981); Ignarro, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 535-560(1990); Kruszyna et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 91, 429-438(1987); Wilcox et al., Chem. Res. Toxicol., 3, 71-76(1990))。他の化合物である S-ニトロソ-N-アセチルペニシ

ラミンは溶液中で酸化窒素を放出し、D N A合成阻害に有効であると報告されている (Garg et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm., 171, 474-479(1990) )。

数多くの酸化窒素-求核剤複合体が報告されている（例えば、Drago, ACS Adv. Chem. Ser., 36, 143-149(1962)）。LonghiおよびDrago, Inorg. Chem., 2, 85 (1963) も参照。これらの複合体の幾つかは加熱または加水分解により酸化窒素を放出することが知られている（例えば、Maragos et al., J. Med. Chem., 34, 3242-3247(1991)）。

インビトロでの、腫瘍細胞における酸化窒素の溶液の細胞増殖抑制効果が証明されてきた。特に、インビトロで、酸化窒素の溶液が腫瘍細胞のD N A合成およびミトコンドリア呼吸を阻害することが示されている (Hibbs et al., Biochem. and Biophys. Res. Comm., 157, 87-94(1988); Stuehr et al., J. Exp. Med., 169, 1543-1555(1989))。

内皮細胞由来平滑筋弛緩因子 (E D R F) は血管平滑筋の弛緩に関与する相互作用剤のカスケードの一部で働く、不安定な体液性の作用剤である。つまりE D R Fは、血流に対する血管抵抗の制御や血圧の制御において重要である。幾つかの血管拡張剤は、内皮細胞からE D R Fを放出させることにより作用する (Furchtgott, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 24, 175-197(1984)を参照)。1987年には、PalmerらはE D R Fが単純な分子である酸化窒素N Oと等価であることを証明した (Nature, 317, 524-526(1987)) が、より最近にはその結論に異論が唱えられている (Myers et al., Nature, 345, 161-163, 1990)。

しかしながら、酸化窒素は純粋な形態では、水性媒体に対して限られた溶解度を有する反応性の高いガスである（窒素酸化物の環境保健規準に関するW H O対

策グループ、窒素酸化物、環境保健規準4 (Oxides of Nitrogen, Environmental Health Criteria 4) (世界保健機関：ジュネーブ、1977年)）。従って、大多数の生物学的システムに酸化窒素を早期に分解させることなく確実に導入することは困難である。

酸化窒素の投与における困難性は、ある場合には酸化窒素を、薬理学上プロド

ラックの形態で投与することにより克服することが可能である。三硝酸グリセリンやニトロフルシドナトリウムといった化合物は比較的安定で、活性化されはじめて酸化窒素を放出する (Ignarro et al., J. Pharmacol. Exp. Ther., 218, 739-749(1981); Ignarro, Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 30, 535-560(1990); Kruszyna et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 91, 429-438(1987); Wilcox et al., Chem. Res. Toxicol., 3, 71-76(1990))。この特徴はある適用では有利となるかもしれないが、重大な障害にもなりうる。例えば、三硝酸グリセリンに対する耐性が、関係する酵素／補因子システムの消耗によって発現する (Ignarro et al., Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25, 171-191(1985); Kuhn et al., J. Cardiovasc. Pharmacol., 14(Suppl. 11), S47-S54(1989))。また、ニトロフルシドの長期投与はシアン化物の代謝産物を生じさせ、毒性につながる (Smith et al., 「生物学的に反応性の中間体の抜粋集」生物学的に反応性の中間体IV、分子的および細胞的效果とそれらの人間の健康に対する影響 ("A Potpourri of Biologically Reactive Intermediates", Biological Reactive Intermediates IV. Molecular and Cellular Effects and Their Impact on Human Health) (Witmer et al.編)、実験医学と生物学における進歩、第283巻 (プレナムプレス、ニューヨーク、1991年) 365～369頁 (Advances in Experimental Medicine and Biology Volume 283 (Plenum Press: New York, 1991), pp. 365-369)。

酸化窒素が内皮細胞から放出され、それが血管平滑筋の弛緩の原因であり、従って血圧の制御ができるという証明は、インビボで酸化窒素を送達することが可能な人工的な薬剤の開発につながった。そのような薬剤の非常に重要なクラスは

酸化窒素－求核剤複合体である。最近、ある種の酸化窒素－求核剤複合体を用いて哺乳類の心臓血管障害を治療する方法が開示された (例えば、米国特許第4,954,526号)。これらの化合物はアニオン性  $N_2O_2^-$  基またはその誘導体を含有する。Maragos et al., J. Med. Chem., 34, 3242-3247(1991)も参照。これらの化合物の多くは薬理学的に特に有望であることが判明した。なぜなら、ニトロフルシドやニトログリセリンのようなニトロ血管拡張剤と異なり、最初に活

性化する必要がなく酸化窒素を放出するからである。純粹に自発的に酸化窒素を放出できることが現在知られている唯一の他のシリーズの薬剤は、R-S-NO構造の化合物群、すなわち、S-ニトロソチオールシリーズである (Stamler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 444-448(1992); Stamler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89, 8087-8091(1992))。しかしながら、R-S-NO → NO反応は速度論的に複雑で、制御が難しい (Morley et al., J. Cardiovasc. Pharmacol., 21, 670-676(1993))。つまり  $N_2O_2^-$  を含有する化合物は、きれいな一次反応を経て、いかなる所定のpHでも分解されて、予測でき、定量的かつ制御され得る量の酸化窒素を供給する点で現在知られている薬剤の中では有利なものである。例えば、Maragos et al., J. Med. Chem., 34, 3242-3247(1991) 参照。

水溶液中で酸化窒素を放出する酸化窒素／求核剤複合体はまた、米国特許第5,039,705号、第5,185,376号、第5,155,137号、第5,208,233号、第5,212,204号、第5,250,550号、第5,366,997号（発行日1994年11月22日）、および係属中の米国特許出願07/764,908（出願日1991年9月24日）、07/858,885（出願日1992年3月27日）、07/867,759（出願日1992年4月13日）、07/935,565（出願日1992年8月24日）、08/017,270（出願日1993年2月12日）および08/121,169（出願日1993年9月14日）にも有用な治療薬として開示されている (Maragos et al., J. Med. Chem., 34, 3242-3247(1991)も参照)。

研究してきた酸化窒素／求核剤付加物は有望であるにもかかわらず、それは媒体中に均一に分布する傾向があるため薬理学的適用は制限されてきた。このような均一分布は多くの研究適用においては非常に有利であるが、作用の選択性を危うくする傾向がある。これらの酸化窒素／求核剤付加物の適用を制限するもう一つの要因は、それらが酸化窒素を比較的速く放出する傾向にある点であり、そのために持続性の生物学的效果を達成するためには頻繁に投与する必要があるということである。すなわち適用部位に酸化窒素放出の効果を集中することがで

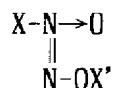
き、効果的な投薬の為に酸化窒素放出を制御することができる酸化窒素放出組成物が必要とされる。

従って本発明の主要な目的は、生理学的な条件下でNOを放出することが可能な、 $N_2O_2^-$ 官能基を結合している生体高分子を含有する高分子組成物を提供することである。本発明の他の目的は、局所、あるいは細胞／組織特異的な放出を果たせるような、NOの放出を制御し得る、 $N_2O_2^-$ 官能基を結合している生体高分子を含有する高分子組成物を提供することである。本発明の別の目的は、NOの放出が持続的な生物学的効果を達成できるような $N_2O_2^-$ 官能基を結合している生体高分子を含有する高分子組成物を提供することである。また、本発明の他の目的は、該生体高分子組成物を含有する医薬組成物を提供することである。本発明のさらなる目的は、該生体高分子組成物の投与を含む、生物学的な障害を治療する方法を提供することである。本発明のこれらのおよびその他の目的や長所、ならびに他の発明の特徴は、ここに述べる発明の記載から明らかとなるだろう。

#### 発明の要旨

本発明は、生理的条件下で酸化窒素を自発的に放出しうる高分子組成物を提供する。高分子組成物は酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が結合する生体高分子を含む。“生体高分子（的）”とは、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチドおよび核酸のようなあらゆる生物学的高分子を含むことを意味し、

これらは自然に生じる、および／または人工的に生じるサブユニットも含む。特別の例示として抗体やその断片および、標的細胞型がその為の受容体を高集団で有するペプチドホルモン、タンパク質および成長因子が挙げられる。本発明の生体高分子結合NONOエート（NONOate）を形成するのに使用される酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基は、式：



（式中、Xは有機または無機部位であり、X'はXと同じでもよいし、あるいは医薬的に許容しうる金属中心あるいは医薬的に許容しうるカチオン等でもよい）

で定義される。N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>基は片方あるいは両方の結合基XおよびX'を通して生体高分子に結合する。

“高分子に結合する”とは、N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が物理的にあるいは化学的に生体高分子の一部と結びつけられている(associated)、生体高分子の一部に取り込まれている(incorporated)、あるいは含まれている(contained)ことを意味する。高分子へのN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基の結合は結合基XあるいはX'を通してN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>基が生体高分子へ共有結合することによって達成される。生体高分子へのN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基の化学結合は、結合基が生体高分子それ自身の一部を形成しているような生体高分子への結合基XあるいはX'の共有結合によってあってもよい。(すなわち、結合基が生体高分子のバックボーン中にあったり、生体高分子のバックボーンにぶらさがっている基に結合している。)酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を高分子の一部と結びつける、生体高分子の一部に取り込ませる、あるいは含ませる、すなわち高分子に「結合する」方法は、本発明ではあまり重要でなく、結びつき(association)、取り込み、結合の全ての方法が考慮される。

本発明の他の局面は、本発明の生体高分子結合酸化窒素放出組成物が生体高分子ではない高分子(以下「非生体高分子」という)に結合あるいは物理的に結びつけることである。

本発明はまた、医薬的に許容しうる担体および酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基

が結合している生体高分子を含む高分子組成物を含む医薬組成物を提供する。

本発明はさらに、生物学的障害を患っている哺乳類に酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が結合している生体高分子を含む高分子組成物を治療に有効な量の酸化窒素を放出するのに十分な量で投与することを含む、酸化窒素の投与が治療となる生物学的障害の治療方法を提供する。

#### 好ましい態様の詳細な説明

本発明は酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を生体高分子に取り込むことによって有用な医薬剤が提供され得るという発見に基づいている。したがって、ここで定義されるようにN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基は「ポリマーに結合している」。ここで使用しているNONOエートという語は、酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>基を短くしたものである。

NONOエートを生体高分子に取り込むことで、目的とする生物学的部位に特異性をもって適用できる生体高分子結合NONOエート組成物を提供するということが発見された。生体高分子結合NONOエートの部位特異的適用は、酸化窒素放出NONOエートの作用の選択性を高める。もし生体高分子に結合している $\text{N}_2\text{O}_2^-$ 官能基が必然的に局在化しているならば、酸化窒素放出の効果はそれらが接触した組織中に集中するだろう。もし生体高分子が可溶性であれば、たとえば標的組織に対して特異的な抗体に結合するあるいはそのような抗体の誘導体とする(derivatization)ことによって、作用の選択性はさらにアレンジすることができる。同様に、重要な受容体のリガンドの認識配列を模倣した小さなペプチドに $\text{N}_2\text{O}_2^-$ 基を結合することにより、核酸中の標的配列との部位特異的な相互作用が可能なオリゴヌクレオチドに結合する場合と同様な、酸化窒素放出の局在化した集中した効果を与える。ホルモンおよび運動性、走化性、いっ出性因子あるいは作用剤を含め、他のタンパク質、ペプチド、ポリペプチド、核酸およびポリサッカロイドも同様に利用することができる。

実例として、ピペラジンモノNONOエート誘導体は、腫瘍細胞走化性において重要なIKVAV認識配列を含むポリペプチドに共有結合することができる。抗走化性剤としての、NOを再生成する能力と腫瘍細胞が接着する傾向にある血管およびリンパ系での腫瘍細胞および／または部位へのIKVAV配列の親和性によって、転移を減少あるいは阻止することさえできる。

他のいかなる特定の理論に束縛されているわけではないが、本発明の生体高分子結合NONOエート組成物の酸化窒素放出の持続性は、組成物の物理的構造と静電効果の両方に帰すると考えられる。したがって、もし生体高分子が不溶性固体であるならば、粒子の表面に近い $\text{N}_2\text{O}_2^-$ 基は速く放出されることが可能であるはずだが、より深く埋め込まれたものは立体的に遮蔽され、酸化窒素が媒体中を進んで行くためにより多くの時間および／またはエネルギーを必要とすると考えられる。予想外にも、 $\text{N}_2\text{O}_2^-$ 官能基の周辺の正電荷の増加によって、酸化窒素発生の半減期もまた増大する傾向があることが見出された。この速度遅延の機構は単に反発静電相互作用、すなわち、 $\text{N}_2\text{O}_2^-$ 基の周辺のH<sup>+</sup>反発正電荷の数が

増大することにより、正電荷に荷電したH<sup>+</sup>イオンのN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基に対する攻撃を阻害し、H<sup>+</sup>が触媒する分解速度を遅延させることに起因するのかもしれない。たとえば、酸化窒素と反応させることで酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を形成させることのできるアミノ基を高分子支持体に結合することによって、消耗することにはならない程度の酸化窒素を用いる治療において、水に曝された後、N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>基周辺の数多くの正に荷電している、酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基からの酸化窒素損失をおこしうるH<sup>+</sup>イオンのアプローチを静電気的に阻害するアンモニウム中央を含む、部分的に変換された構造を製造することができる。

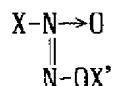
生体高分子に結合した酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基は一般に水性の環境と接触すると、水性の環境において自発的に酸化窒素を放出することができる。すなわち、当該官能基は、三硝酸グリセリンやニトロフルシドナトリウムに必要とされるような酸化還元反応あるいは電子伝達によって活性化する必要がない。本発明に関して有用な酸化窒素／求核剤複合体の幾つかは特定の方法による活性化が

必要なものもあるが、これは単に目的とする特定の細胞の周辺で酸化窒素を放出するX[N(O)NO]<sup>-</sup>基を遊離させるために必要なだけである。たとえば、アニオン性[N(O)NO]<sup>-</sup>官能基に保護基を共有結合させることにより、代謝により保護基を除去することのできる器官に分子が到達するまで酸化窒素放出を遅らせる手段が提供される。たとえば、目的とする腫瘍、生物学的障害、細胞、または組織に特異的な酵素により選択的に開裂される保護基を選択することにより、所望の効果が最大限に奏するよう酸化窒素／求核剤複合体の作用の目標を定めることができる。本発明の生体高分子結合NONOエート組成物は水溶液中で酸化窒素を放出することができるが、そのような化合物は生理的条件下で酸化窒素を放出するのが好ましい。

たとえば、NONOエート官能基は、腫瘍特異抗体または1個以上のタンパク質の機能には必要でないリジン側鎖アミノ基をもつ他のタンパク質に、該リジン基を、先ずリジンアミノ窒素に共有結合し、その次の段階で該分子の他の場所に隔てられている遊離のチオールを含むO-官能性NONOエートのイオウ原子に共有結合することができる誘導体化剤(derivatizing agent)と反応させることに

よって結合することができる。そのようなタンパク質を全身投与した後、ひとたび目的的組織に届くと、酸素に結合した置換基が酵素的に、あるいは加水分解的に脱離して、アニオン性N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートの機能を解放しその部位でNO放出が集中する。

本発明の生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートを生成するのに用いられる酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基の好ましいものとして、式：

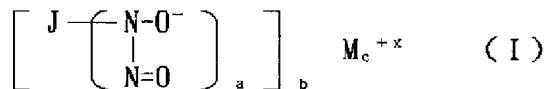


(式中、Xは有機または無機部位であり、X'は有機または無機置換基、医薬的に許容しうる金属中心、医薬的に許容しうるカチオン等である)で定義されるものが挙げられる。該N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>基は片方あるいは両方の結合基XおよびX'を通して生体高分子に結合する。

酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基は、好ましくは酸化窒素／求核剤付加物、たとえば、酸化窒素と求核剤との複合体であり、最も好ましくはアニオン性部位X[N(O)NO]<sup>-</sup>(式中、Xは任意の適当な求核剤残基を示す)を含む酸化窒素／求核剤複合体である。求核剤残基は、好ましくは第一アミン(例えば、(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNH[N(O)NO]NaにおけるX=(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CHNH)、第二アミン(例えば、(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N[N(O)NO]NaにおけるX=(CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>N)、ポリアミン(例えば、両性イオンH<sub>2</sub>N(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>N[N(O)NO]<sup>-</sup>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>NH<sub>2</sub>におけるX=スペルミン、両性イオンCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>N[N(O)NO]<sup>-</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>におけるX=2-(エチルアミノ)エチルアミン、または両性イオンCH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>N[N(O)NO]<sup>-</sup>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>3</sub><sup>+</sup>におけるX=3-(n-プロピルアミノ)プロピルアミン)、またはオキシド(すなわち、NaO[N(O)NO]NaにおけるX=O<sup>-</sup>)、またはそれらの誘導体である。このような酸化窒素／求核剤複合体は、酸化窒素を予測された速度で生物学的に使用可能な形態で送達することができる。

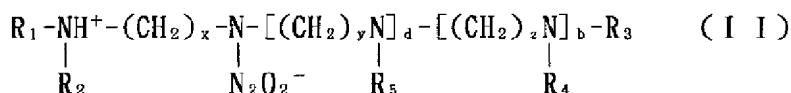
他の適切な酸化窒素／求核剤複合体としては、次式で表されるものが例示される。

言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 208, 233号に記載されている



〔式中、Jは有機または無機部位であり、 $M_c^{+x}$ は医薬上許容されるカチオン（式中、xはカチオンの原子価である）であり、aは少なくとも1の整数であり、bおよびcは中性化合物を与える最も小さい整数である。〕

言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 155, 137号に記載されている

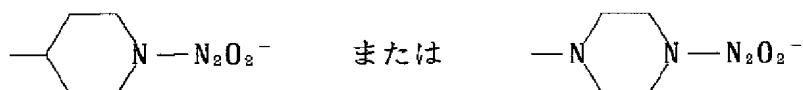


（式中、bおよびdは同一または異なって0または1であり、 $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ および $R_5$ は同一または異なって水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、x、yおよびzは同一または異なって2～12の整数である。）

言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 155, 137号に記載されている

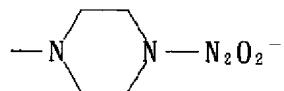


（式中、Bは



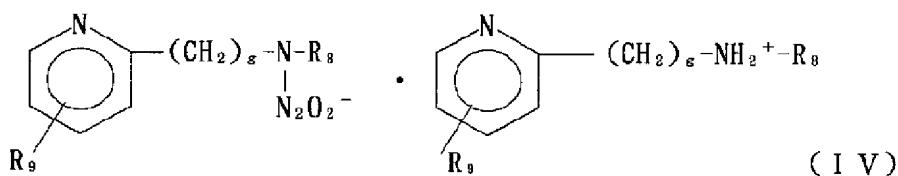
であり、 $R_6$ および $R_7$ は同一または異なって水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、

トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、fは0~12の整数であり、ただしBが置換されたピペラジン部位



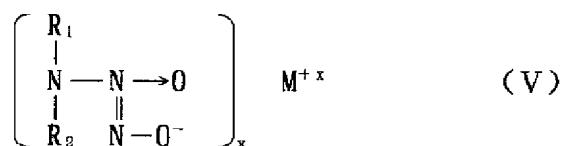
の場合、fは2~12の整数である。)

言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 250, 550号に記載されている



(式中、R<sub>8</sub>は水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、R<sub>9</sub>は水素またはC<sub>1-C12</sub>直鎖または分枝鎖アルキルであり、gは2~6である。)

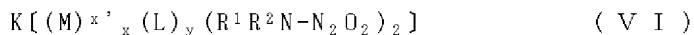
言及によってここに組み入れられる米国特許第5, 039, 705号および同第5, 208, 233号および1993年2月12日に出願された米国特許出願番号08/017, 270に記載されている



(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は独立して直鎖または分枝鎖C<sub>1-C12</sub>アルキル基およびベンジル基からなる群より選ばれ、あるいはR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が窒素原子と共に結合して、複素環基、好ましくはピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモ

ルホリノ基を形成し、 $M^{+x}$ は医薬上許容されるカチオンであり、 $x$ はカチオンの原子価である。)

言及によってここに組み入れられる1992年3月27日に出願された米国特許出願番号07/858,885に記載されている



(式中、 $M$ は医薬上許容される金属、または $x$ が少なくとも2の場合、異なる2種の医薬上許容される金属の混合物であり、 $L$ は $(R^1R^2N-N_2O_2)$ とは異なる配位子であり、少なくとも1つの金属に結合しており、 $R^1$ および $R^2$ はそれぞれ有機部位であり、それらは同一または異なっていてよく、 $x$ は1～10の整数であり、 $x'$ は金属 $M$ の形式的な酸化状態(formal oxidation state)を示し、1～6の整数であり、 $y$ は1～18の整数であり、 $y$ が2以上の場合、配位子 $L$ は同一または異なっていてもよく、 $z$ は1～20の整数であり、 $K$ は化合物を必要な程度まで中性にする医薬上許容しうる対イオンである。)

言及によってここに組み入れられる米国特許第4,954,526号に記載されている



(式中、 $R$ は $C_{2-8}$ 低級アルキル、フェニル、ベンジルまたは $C_{3-8}$ シクロアルキルであり、 $R$ 基は1～3個の置換基で置換されていてもよく、その置換基は同一または異なっていて、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_{1-8}$ アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-CH(O)$ 、 $-C(O)OH$ および $-NO_2$ からなる群より選ばれ、 $X$ は医薬上許容されるカチオン、医薬上許容される金属中心、または $C_{1-8}$ 低級アルキル、 $-C(O)CH_3$ および $-C(O)NH_2$ からなる群より選ばれる医薬上許容される有機基であり、 $y$ は1～3であり、 $X$ の原子価と一致する。)

言及によってここに組み入れられる1992年9月23日に出願された米国特許出願番号07/950,637に記載されている



(式中、 $R_1$ および $R_2$ は独立して、 $C_{1-12}$ 直鎖アルキル、アルコキシまたはアシ

ルオキシで置換されたC<sub>1-12</sub>直鎖アルキル、ヒドロキシまたはハロゲン置換されたC<sub>2-12</sub>直鎖アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、ヒドロキシ、ハロゲン、アルコキシまたはアシルオキシで置換されたC<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、C<sub>3-12</sub>直鎖オレフィンおよびC<sub>3-12</sub>分枝鎖オレフィン（これらは置換されていないか、またはヒドロキシ、アルコキシ、アシルオキシ、ハロゲンまたはベンジルで置換されている）から選ばれるか、あるいはR<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびそれらが結合している窒素原子と共に複素環基、好ましくはピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を形成し、R<sub>3</sub>は、置換されていないか、またはヒドロキシ、ハロゲン、アルコキシまたはアシルオキシで置換されているC<sub>1-12</sub>直鎖およびC<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはハロゲン、アルコキシ、アシルオキシまたはヒドロキシで置換されているC<sub>2-12</sub>直鎖またはC<sub>3-12</sub>分枝鎖オレフィン、置換されていないかまたは置換されているC<sub>1-12</sub>アシル、スルホニルおよびカルボキサミドから選ばれる基、あるいはR<sub>3</sub>は式-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-O-N=N(O)-NR<sub>1</sub>R<sub>2</sub>（式中、nは2～8の整数であり、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は上記に定義した通り）で表される基であり、ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はヘテロ原子のαにハロゲンまたはヒドロキシ置換基(a halo or a hydroxy substituent α to a hetero atom)を含まない。】

本発明に関して、広範な種類の如何なる生体高分子も使用可能である。使用に好適な生体高分子としては、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、核酸（例えばRNAやDNA）、抗体、ペプチドホルモン、糖タンパ

ク質、グリコーゲン等が挙げられる。あるいは、脂肪酸、グルコース、アミノ酸、コハク酸塩、リボヌクレオチド、リボヌクレオシド、デオキシリボヌクレオチド、およびデオキシリボヌクレオシド等の生体高分子のサブユニットが使用できる。具体例としては、抗体あるいはその断片；ラミニンやフィブロネクチン等の細胞外マトリックスタンパク質あるいは、それらの細胞接着(cell-attachment)部位のペプチド認識配列(RGDS、IKVAV、YIGSR等)；成長因子、ペプチドホルモン、およびその他の細胞表面の受容体部位と高い親和性を有するポリペプチド(EGF、TGFα、TGFβおよびTNF等)が挙げられる。そ

のような分子は、受容体に結合する際、標的細胞に内部移行し、それにより N O の供与体部位の細胞内送達を容易にする。

酸化窒素放出 N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基は、上記の式を有するタイプの酸化窒素／求核剤複合体を、その場で生体高分子上に形成することにより、生体高分子に結合されてもよい。N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基は、生体高分子のバックボーンの原子に結合するか、生体高分子バックボーンにぶらさがっている基に結合しても、あるいは単に生体高分子マトリックスに補足されるだけでもよい。N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が生体高分子バックボーンに結合している場合、生体高分子は将来の放出のために酸化窒素と反応して該酸化窒素を結合する部位をバックボーンに有する。該生体高分子は、例えば、酸化窒素と反応して、窒素原子で N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を形成する求核窒素原子をバックボーン中にもつ。N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が生体高分子バックボーンにぶらさがっている基の場合、生体高分子は、酸化窒素と反応して N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を形成し得る、適当なぶらさがった求核剤残基を含むか、あるいは当該求核剤残基で誘導体とされている。このように、適当な求核残基を含む生体高分子または適当に誘導体とされた生体高分子と酸化窒素との反応は、生体高分子結合酸化窒素放出 N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を提供する。

生体高分子結合酸化窒素放出 N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を形成するためには、一般に N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が形成されるべき生体高分子上の部位の近くの高分子に対して、実効電荷を与えることが好ましい。実例として、幾つかの一般的な方法が N O N O

エート官能基に結合した生体高分子を含有する生体高分子組成物の合成に利用可能である。一例として、X-N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>の構造を有するイオンを求電子剤（[X]<sup>+</sup>供与体）と反応させると、式 X-N(O) = N O X' で表される共有結合 N O N O エートが得られる。ついで、この保護された複合体を所望の生体高分子に、求核剤残基 X あるいは求電子残基 X' を介して結合させる。あるいは、すでに生体高分子の一部である（あるいは結合している）求核剤残基から、基本的な条件下で N O と反応させることにより、N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基を含有する酸化窒素複合体を製造することができる。特例として、第二アミノ基を有する单一のアミノ酸を酸化窒素と反応して本発明による化合物を製造することができる。同様に、N O N O

エート官能基はペプチド内で塩基性窒素に結合することができる。他の方法でも本発明に従ってN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エート含有分子をペプチド、ポリペプチドあるいはタンパク質内のチオール基あるいは活性化されたカルボン酸基に結合させることができる。

さらに、実例として、N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基をarg-gly-asp (RGD)のようなペプチドに結合してarg-gly-asp-[N(O)NO]<sup>-</sup>分子を製造してもよい。好ましくは、RGDトリペプチドはN<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートに追加のペプチド単位といった結合基を介して結合させる。他の受容体／リガンド認識配列も同じように使用される。

本発明の生体高分子結合酸化窒素放出組成物は、治療されるべき生物学的障害に応じて、広範な種類の適用および広範な種類の形態において有用性が知られているであろう。例えば、目的に好適なように、生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートはそれ自体で構造的に十分にインプラント、パッチ、ステント、リポソーム、マイクロ粒子、マイクロスフェア、ビーズ、顆粒、液体、ゲル、モノリス樹脂、ディスク等として働き、あるいは生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートは非生体高分子等とも結合することができる。ここで用いられる非生体高分子という語は、生体高分子でない全ての高分子を意味する。さらに、実例として、生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エート組成物は他の高分子マトリックス、基質等に取り込まれたり、あるいはマイクロカプセル化したりしてもよい。

本発明の生体高分子結合酸化窒素／求核剤組成物は広範囲の生物学的利用性を有する。酸化窒素が、特に多能でバイオエフェクター種としても重要であり、血管緊張低下、神経伝達および免疫反応のような重大な身体の機能において機能的に関与している (Moncada et al., Pharmacol. Rev., 43, 109-142(1991)) という高まりつつある認識に鑑みて、酸化窒素放出が必要とされる適用に、本発明の組成物は有用性が見い出される。例えば、生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートを血管形成術後の再狭窄の危険性を減ずるために使用してもよい。

さらに詳細に、が、本発明はこれになんら限定されることなく本発明の生体高分子結合組成物の広範な使用および適用について説明する。即ち、例えば酸化窒

素によってもたらされる劇的ではあるが短期間の、肺の血管および気管支の拡張特性 (Roberts et al., Circulation (Suppl. II), 84, A1279(1991)) に鑑みて、生体高分子結合酸化窒素／求核剤付加物組成物のエアロゾル形態での肺への投与を、多様な肺障害の治療に使用してもよい。天然の、内因性の酸化窒素は陰茎勃起のエフェクターとして同定されているので (Blakeslee, New York Times, 1992年1月9日, A1頁)、本発明の生体高分子結合酸化窒素／求核剤付加物組成物は男性のインポテンツの治療のための適当な陰茎インプラント、経尿道投与用製剤、経皮投与用パッチ剤あるいはコンドームに組み込むことができる。ある種の単量体酸化窒素／求核剤付加物の血小板凝集の阻害能は、立証されている細胞増殖抑制活性とあいまって、血管形成後の再狭窄の予防の為の非常に貴重な二股のアプローチ(two-pronged approach)を予期させる。すなわち、高分子結合酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基組成物で製造されるステントは、損傷をうけた内皮部位での細胞の分裂を阻害し、そしてこれらの部位での血小板の付着も予防するという両方に用いることができ、閉塞の再発の危険性を最小限にする。腫瘍細胞による酸化窒素の生成と該細胞の転移能間の反比例の関係が提案されているので (Radomski et al., Cancer Res., 51, 6073-6078(1991))、高分子結合酸化窒素／求核剤組成物を癌患者における転移の危険性を減ずるのに用いることができる。

できる。同様に本発明の生体高分子結合酸化窒素放出組成物は、プロテーゼや胸部インプラントのような医療用インプラントに関わる固形癌の発生の危険性を減ずる手段として、生体に外科的に連結する前にそれらを被覆するのに用いることができる事が予測される。 $N_2O_2^-$  官能基を有する腫瘍特異的な抗体は、癌細胞を放射線治療に感作的にするのに用いることができる。 $N_2O_2^-$  官能基は、子宮内に集中するホルモンに結合させることができ、そこでのNOの放出は、早産をとめることができる。さらに酸化窒素は、胃の運動性、神経伝達、侵害受容、およびその他の本来自然な役割にも関連していることが暗示されているので、本発明の組成物はそれらの適用においても使用することができる。

本発明の別の局面は、本発明の新規な生体高分子結合酸化窒素放出組成物および共に係属中の出願番号07/935, 565号に開示されている非生体高分子

とを含む高分子結合酸化窒素放出組成物を提供することである。本発明のこの局面によれば、ここで述べられた生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートは、非生体高分子に組み入れられるか、あるいは結合される。この用途に関しては、広範な種類の如何なる高分子も使用可能である。選択される高分子は、ただ、生物学的に許容し得るものであればよい。本発明において使用に適した高分子を例示すれば、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリテトラフルオロエチレン、ポリビニリデンジフルオライド、ポリビニルクロライド等のポリオレフィン類；ポリエチレンイミンまたはその誘導体類；ポリエチレングリコール等のポリエーテル類；ポリサッカライド類；ポリ（ラクチド／グリコリド）等のポリエステル類；ナイロン等のポリアミド類；ポリウレタン類；コレステボールおよびその誘導体類が挙げられる。上述の生体高分子酸化窒素放出組成物は、非生体高分子支持体に多数の異なる方法で結合させることができる。例えば、生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートは、生体高分子を非生体高分子とともに共沈させることにより、該非生体高分子に結合できる。共沈方法は、例えば、非生体高分子と生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートとを可溶化し、溶媒を留去させることを含む。あるいは、生体高分子結合N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>エートを化学的に非生体高分子に結合させてもよい。

本発明において使用に適した非生体高分子の物理的および構造的特徴は狭く臨界的なものではなく、むしろ最終的な用途に依存する。得られた高分子組成物が局所、皮膚、経皮あるいは同様の使用を意図する場合には、当該組成物が生物分解性である必要がないことは、当業者であれば理解されるであろう。経口摂取等のある用途にとっては、非生体高分子が生理的環境下においてゆっくりと溶解すること、あるいは生物分解性であることが望ましい。得られた高分子形態は、生理的液体中で生体腐食性（bioerodible）、恒久性、あるいは即溶性（instantly soluble）であり得る。

本発明の生体高分子結合酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基組成物を動物に投与する適当な方法を利用し得ること、およびある特定の組成物を投与するために一を超える投与経路を用いることができるが、ある特定の投与経路が別の投与経路よりも、より迅速により効果的な反応を提供することは、当業者であれば理解できる

であろう。医薬的に許容される担体もまた当業者によく知られている。担体の選択は、特定の組成物ならびに該組成物を投与するために用いられる特定の方法によりある程度決定されるだろう。従って、本発明の医薬組成物の適当な製剤は多種多様である。

経口投与に適した製剤は、(a)水または生理食塩水のような希釈剤に溶解した有効量の生体高分子結合組成物のような液体溶液、(b)予め決められた量の活性成分を固体又は顆粒としてそれぞれ含むカプセル剤、小袋剤(sachet)、錠剤、(c)適当な液体に懸濁した懸濁剤、および(d)適当な乳剤からなりうる。錠剤は、乳糖、マンニトール、トウモロコシ澱粉、バレイショ澱粉、微結晶セルロース、アラビアゴム、ゼラチン、コロイドシリコンジオキシド、クロスカルメロースナトリウム、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、及び他の賦形剤、着色剤、希釈剤、緩衝剤、湿潤剤、保存剤、矯味剤、及び薬理学的に適合し得る担体の一またはそれ以上を含んでいてもよい。ロゼンジ剤は、矯味剤、通常、ショ糖およびアラビアゴムまたはトラガント中に活性成分を含み、同様に香剤は、ゼラチンおよびグリセリンまたはショ糖およびアラビアゴム乳剤、ゲル

剤等の不活性基剤中に活性成分を含み、活性成分に加えて当分野で知られた担体を含む。

本発明の生体高分子結合酸化窒素放出組成物は、単独でまたは他の適当な成分と組み合わせて、吸入により投与されるエアロゾル製剤に調製され得る。これらエアロゾル製剤は、ジクロロジフルオロメタン、プロパン、窒素等の加圧された許容し得る噴射剤中に置かれる。

非経口投与に適切な製剤としては、抗酸化剤、緩衝液、制菌剤および該製剤を投薬を受ける者の血液と等張にするための溶質を含有することができる水性および非水性の等張性無菌注射溶液、および懸濁化剤、溶解補助剤、増粘剤、安定化剤および保存剤を含有することができる水性および非水性の無菌の懸濁液が含まれる。該製剤は、アンプルおよびバイアルのような1回投与量または複数回投与量の密閉された容器で供せられ、注射には使用直前に、例えば水のような無菌

の液体担体を添加するだけでよいフリーズドライ（凍結乾燥）した状態で保存され得る。即席注射溶液および懸濁液は前に述べた種類の無菌の粉末剤、顆粒剤および錠剤から調製され得る。

本発明において動物、特にヒトに投与する量は、適当な時間枠にわたって動物に対して治療の効果を奏するのに十分なものとすべきである。投与量は、用いられるある特定の組成物の強さ、治療すべき動物の状態および体重により決定されるであろう。投与量はまた、ある特定組成物の投与に伴うかもしれない悪い副作用の有無、性質及び程度によっても決定されるであろう。

以下の実施例により本発明をさらに説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

実施例において、酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基を含有する高分子から酸処理により回収され得る酸化窒素の総量の化学発光分析は次のようにして行った。

$N$   $O$  付加物、すなわち酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基を含有する高分子の分析は酸化窒素分析機上で行い、Maragos et al., J. Med. Chem., 34, 3242-3247(1991)の方法に従ってパターン化した。セプタムを付けた反応容器に試験すべき

高分子の少量の一定量を充填し、この系をヘリウムで数分間洗浄して微量の酸素を除去した。10 mM 硫酸 2 mL をセプタムを通して注入し反応を開始した。気体状の放出物を、反応容器の底に置いた（すなわち、酸溶液に浸漬した）フリットガラス気泡放出管を介して継続的に化学発光検出器(サーマルエネルギーアナライザーモデル 502LC, Thermal Energy Analyzer Model 502LC, ThermoSciences, Inc., Woburn, MA)に吹き込んだ。得られた化学発光シグナルの時間に対する曲線がなす面積を電子的にコンピューター処理し、既知量の酸化窒素ガス標準と比較することにより、一定量の高分子の酸処理により発生した酸化窒素の量を測定した。

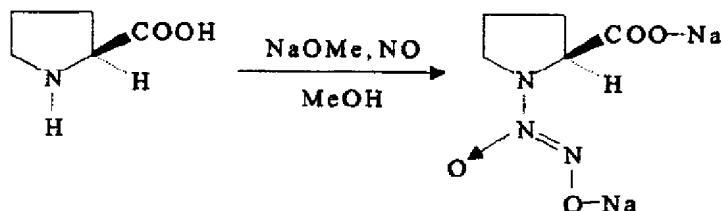
高分子から回収され得る酸化窒素の総量を算出するためにこの方法を用いた。生理的条件下での酸化窒素発生の割合を算出するために、硫酸溶液の代わりに10 mM リン酸緩衝液 (pH 7.4, 37°C) 2 mL を反応容器に注入して反応を開始した以外は上記と同じ方法で本発明の高分子を処理した。

実施例

以下の実施例において、酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基を含有する生体高分子の調製および特性解析について説明する。

実施例 I

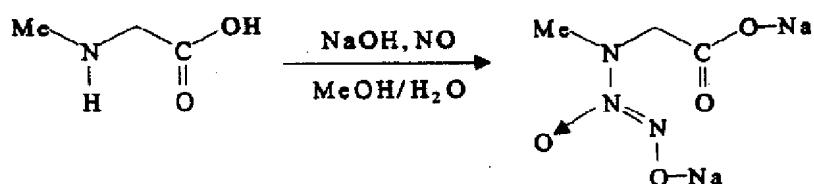
この実施例では、以下に模式的に示すように、1-(2S-カルボキシピロリジン-1-イル)-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンニナトリウム塩の調製について説明する。



25%ナトリウムメトキシド(メタノール中)39m1(0.18mol)およびメタノール20m1中の、L-プロリン10g(0.087mol)の溶液を脱気し、40psiのNOに20時間曝露した。圧力を緩めて固体残渣を沪過にて集め、エーテルで洗浄し、減圧下で乾燥して白色固体17gを得た：UV(0.01M NaOH)  $\lambda_{max}$ ( $\epsilon$ ) 250 nm( $\epsilon$  = 4.9 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)；NMR(D<sub>2</sub>O) δ 1.71(m, 1H), 1.91(m, 2H), 2.27(m, 1H), 3.27-3.43(m, 2H), 4.04(m, 1H)。メタノールのピークも存在したが、該固体にはプロリンおよびN-ニトロソプロリンは両方とも含まれなかった。

実施例 II

この実施例では、以下に模式的に示すように、1-ヒドロキシ-2-オキソ-3-カルボキシメチル-3-メチル-1-トリアゼンニナトリウム塩の調製について説明する。



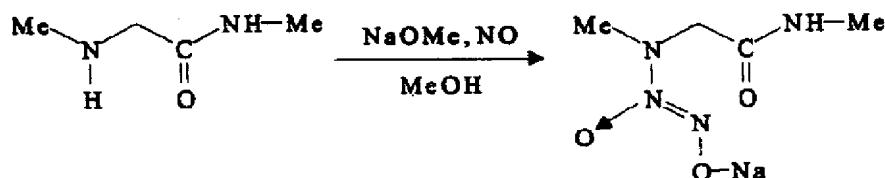
メタノール100m1および水20m1中の、水酸化ナトリウム8g(0.2

m o 1) の溶液にサルコシン 8.9 g (0.1 m o 1) を加えた。該溶液に 40 p s i の N O を負荷し、25°Cで48時間攪拌した。圧力を緩め、該溶液を減圧で溶媒留去して、UV  $\lambda_{\text{max}}$  250 nmの白色固体を得た。該蒸留物は強いアミン臭を有し、メチルアミンの塩化ベンゾイル誘導体であると決定された。

該固体残渣を高真空下で乾燥後、D<sub>2</sub>O 中の N M R により解析した。N M R により5つの生成物が検出された：メチルアミン， $\delta$  2.28, 36%；1-ジメチルアミノ-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンナトリウム塩， $\delta$  2.79, 15%；N-ニトロソジメチルアミン， $\delta$  3.11 および 3.91, 8%；N-ニトロソサルコシンナトリウム塩， $\delta$  3.15(s, E メチル), 3.84(s, Z メチル), 4.21(s, Z メチレン), 4.80(s, E メチレン), 10%。標記化合物は該混合物の 32%として存在した： $\delta$  3.11(s, 3H) および 3.60(s, 2H)。

### 実施例 III

この実施例では、以下に模式的に示すように、1-ヒドロキシ-2-オキソ-3-カルボキシメチル-3-メチル-1-トリアゼンN-メチルアミドナトリウム塩の調製について説明する。



40%メチルアミン水溶液 150 ml (1.9 m o 1) を 0°Cまで冷却した。該溶液に 10 M 水酸化ナトリウム 40 ml を加え、続いて  $\alpha$ -クロロアセチルクロリド (2.7 g, 0.24 m o 1) を 0°Cで2時間かけて注意深く加えた。

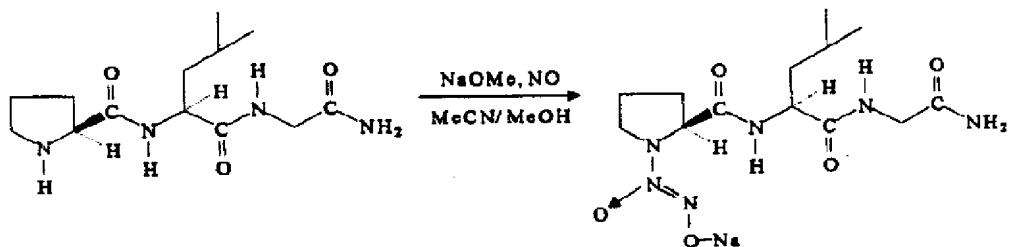
室温にて一晩攪拌し続けた。得られた溶液を塩化ナトリウムで飽和、ジクロロメタンで抽出して硫酸ナトリウム上で乾燥し、硫酸マグネシウム層を通して沪過した。溶媒のほとんどをロータリーエバポレーターで除去し、残渣を 1 気圧にて、次いで適当な減圧下で蒸留した。該生成物を 90~2°C、125 mm Hg で蒸留し、サルコシンN-メチルアミド 1.5 g (61%)を得た：IR (film) 3318, 2952, 2889, 1659, 1553, 1462, 1413, 1166 cm<sup>-1</sup>；NMR (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  2.42(s, 3H

), 2.86(s, 1.5H), 2.83(s, 1.5H), 3.23(s, 2H)。

25%ナトリウムメトキシド(メタノール中)3.5ml(0.016mol)中のサルコシンN-メチルアミド1.7g(0.0167mol)の溶液を圧力ビン中に置き、窒素をどっと流した後40psiの酸化窒素を負荷した。該溶液を48時間25°Cに保って濃厚なペーストを得た。圧力を緩め、残渣をエーテルで洗浄し、減圧下で乾燥して、UV  $\lambda_{\text{max}} (\epsilon)$  250 nm (2.4 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) の固体1.4gを得た。

#### 実施例IV

この実施例では、以下に模式的に示すように、L-プロリル-L-ロイシルグリシンアミドのビス(酸化窒素)付加物の調製について説明する。

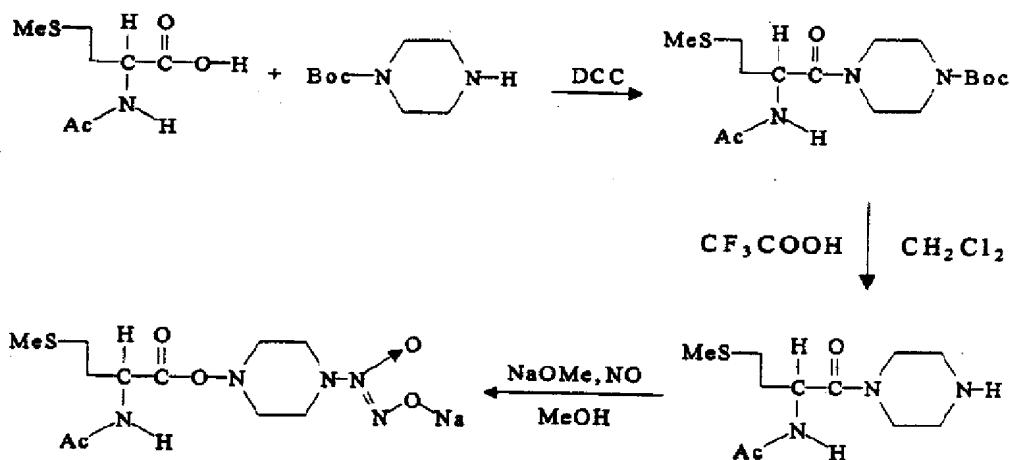


アセトニトリル4ml中のL-プロリル-L-ロイシルグリシンアミド(Sigma)120mg(0.423mmol)のスラリーに、メタノール中の25%ナトリウムメトキシド100μlを加えた。得られたゲルを均一な溶液が得られるまで数滴のメタノールで処理した。該溶液を微小Parrビンに移し、5分間窒素で発泡した後40psiのNOに72時間曝露した。該反応混合物を減圧下で乾燥して、pH7.4の緩衝液中の $\lambda_{\text{max}} (\epsilon)$  250 nm (6.2 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>)の固体187mgを得た。この固体は37°Cで7分の半減期で0.86molのNO(このpHで分解されるトリペプチド1molあたり)を放出した。

鎖長を増したオリゴペプチドおよびタンパク質も同様にNOによって誘導することができる。

#### 実施例V

この実施例では、以下に模式的に示すように、NOと容易に反応する求核中心を含まないタンパク質への求核中心の結合について説明する。



CC(=O)C(C(=O)SC)N : アセトニトリル (120 ml) 中の N-アセチル-L-メチオニン 4.78 g (0.025 mol) の溶液を 0°C に冷却した。この溶液にジシクロヘキシリカルボジイミド (DCC) 5.36 g (0.025 mol) を加えた後、ジクロロメタン 6 ml 中の N-t-ブトキシカルボニルビペラジン 3.90 g (0.021 mol) をすばやく加えた。アセトニトリル : テトラヒドロフラン (4 : 1) で展開したシリカゲル TLC プレート上で反応を追跡し、ヨウ素あるいはニンヒドリンスプレーのいずれかを用いて可視化した。反応は 2 時間以内に完了した。該反応混合物に数滴の水酢酸を加え、溶媒をロータリーエバボレー

ターで除去した。残渣をエーテル中に溶解して沪過した。透明な沪液を希酸、次いで希塩基で洗浄した。有機層を分離し、無水硫酸ナトリウムで乾燥、沪過し、さらに溶媒留去して、1-(t-ブトキシカルボニル)-4-(N-アセチル-L-メチオニル)ビペラジンの、さらなる精製を要しない無色の油 8.2 g を得た: IR (film) 3304, 3058, 2973, 2931, 2868, 1701, 1645, 1539, 1420, 1237, 1173  $\text{cm}^{-1}$ ; NMR ( $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  1.47(s, 9H), 1.80(m, 2H), 2.02(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.46(m, 2H), 3.53(m, 8H), 5.10(M, 1H), 6.35(b, 0.5H), 6.43(b, 0.5H)。

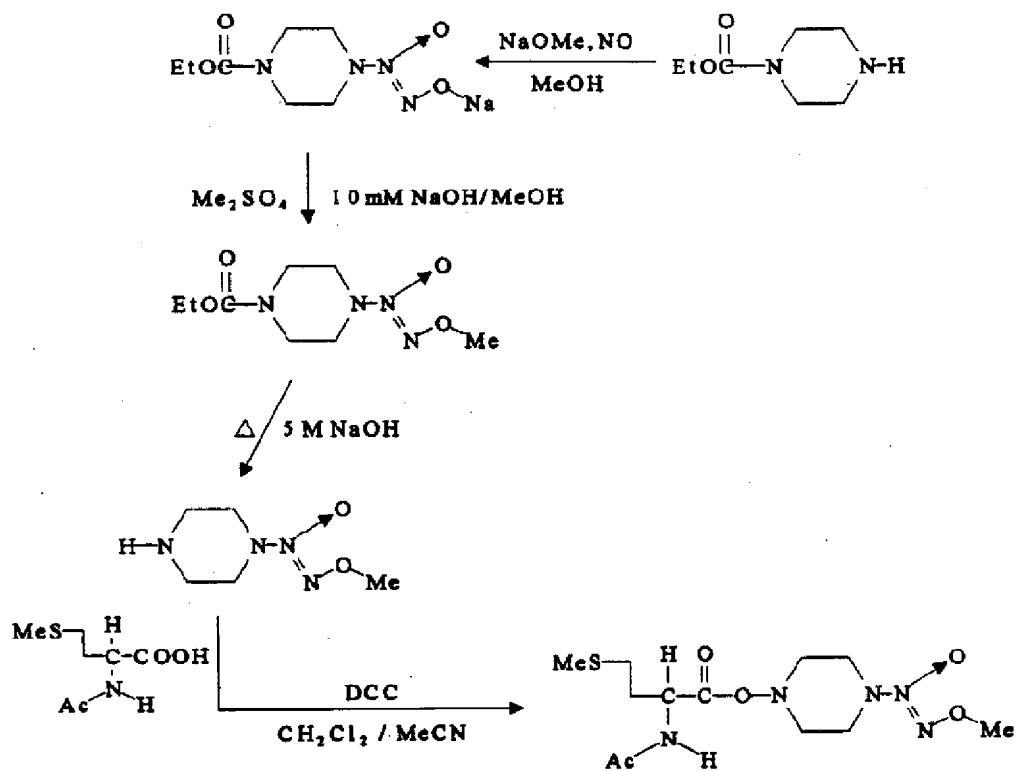
ジクロロメタン 60 ml 中の 1-(t-ブトキシカルボニル)-4-(N-アセチル-L-メチオニル)ビペラジン 8.6 g (0.024 mol) の溶液に、トリフルオロ酢酸 10 ml を加え、該混合物を室温にて一晩攪拌した。該溶液を

水で抽出し、得られた水性溶液を水酸化ナトリウムを用いてアルカリ性にした。該生成物をジクロロメタンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥後沪過した。溶媒を留去して 1-(N-アセチル-L-メチオニル) ピペラジン 2. 1 g を油として得た: IR (film) 3304, 3051, 2917, 2861, 1645, 1546, 1448, 1377 cm<sup>-1</sup>; NMR (CDCl<sub>3</sub>) δ 1.95(m, 2H), 2.02(s, 3H), 2.10(s, 3H), 2.54(m, 2H), 2.98(m, 4H), 3.74(m, 4H), 5.10(m, 1H), 6.40(b, 0.5H), 6.48(b, 0.5H)。

メタノール 1 m l 中の 1-(N-アセチル-L-メチオニル) ピペラジン 5 1 0 m g (1. 97 mmol) の溶液に、メタノール中の 25% ナトリウムメトキシド 4 2 8 μl (1. 97 mmol) を加えた。この系を脱気して 4 0 p s i の酸化窒素を負荷した。該溶液を NO に 1 2 0 時間曝露した後、圧力を緩めて固体生成物を沪過にて集め、エーテルで洗浄後、乾燥して 1-[4-(N-アセチル-L-メチオニル) ピペラジン-1-イル]-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンナトリウム塩 2 7 m g を、UV λ<sub>max</sub> (ε) 252 nm (12.0 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) の白色固体として得た。該生成物は pH 7 および 25°C にて 6. 9 分の半減期で分解して試薬 1 m o l あたり 1. 7 2 m o l の NO を生成した。

#### 実施例VI

この実施例では、以下に模式的に示すように、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質の C 末端に、前もって形成しておいた求核窒素原子を含む NO<sub>2</sub>NO エートの結合について説明する。



メタノール 60 ml 中のエチル 1 - ピペラジンカルボキシレート 20 g (0.126 mol) の溶液を Parr ピン中に置き、該溶液をメタノール中の 2.5% ナトリウムメトキシド 27.4 ml (0.126 mol) で処理した。この系を脱気し、40 psi の酸化窒素を負荷して 25°C に 48 時間保った。白色結晶状生成物を沪集し、冷メタノール、さらに多量のエーテルで洗浄した。該生成物を減圧乾燥して収量 14.5 g (48%) の 1 - (4 - カルベトキシビペラジン - 1 - イル) - 1 - オキソ - 2 - ヒドロキシジアゼンナトリウム塩を得た：融点 1

84-5°C；UV (0.01 M NaOH)  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) 252 nm ( $10.4 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )；NMR ( $D_2O$ )  $\delta$  1.25(t, 3H), 3.11(m, 2H), 3.68(m, 2H), 4.15(q, 2H)。

元素分析 C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Na 計算値：C, 35.00%; H, 5.42%; N, 23.33%; Na, 9.58%。実測値：C, 34.87%; H, 5.53%; N, 23.26%; Na, 9.69%。この化合物の pH 7 および 25°C での半減期は 5 分であった。この測定は紫外線スペクトルにおける 252 nm の発色団の消失に基づいた。

0.01M水酸化ナトリウム水溶液10m1中の1-(4-カルベトキシピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-ヒドロキシジアゼンナトリウム塩1.3g(5.4mmol)の溶液を氷浴中で冷却した。メタノール10m1中の硫酸ジメチル2m1の溶液を滴下しながら加えた。得られた溶液を0°Cにて1時間攪拌した後、室温まで徐々に加温した。24時間後、該溶液をロータリーエバボレーターで濃縮した。残渣をジクロロメタンで抽出し、硫酸ナトリウムで乾燥して硫酸マグネシウム層を通して沪過した。溶媒を減圧下で留去し、残渣をシリカゲル上のクロマトグラフィーにかけた。ジクロロメタン：酢酸エチル(2:1)で溶出することにより、1-(4-カルベトキシピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン683mg(55%)が油として得られ、静置することにより結晶化した：融点 46°C；UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) 240nm(8.4 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)；IR (film) 2988, 2945, 2875, 1707, 1504, 1068 cm<sup>-1</sup>；NMR  $\delta$  3.38(m, 4H), 3.67(m, 4H), 4.03(s, 3H), 4.16(q, 2H)；MS m/z(相対強度, %), 232(M<sup>+</sup>, 3), 217(16), 187(10), 157(100), 142(5), 98(4), 85(27), 70(26), 56(94), 54(19)；C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>の計算される正確な質量(M<sup>+</sup>) 232.1171, 実測値 232.1172。元素分析 C<sub>8</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub> 計算値：C, 41.38%；H, 6.90%；N, 24.14%。実測値：C, 41.23%；H, 6.82%；N, 24.05%。

1-(4-カルベトキシピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン1.8g(0.0078mmol)と5M水酸化ナトリウム水溶液20m1の混合物を還流加熱した。定性的薄層クロマトグラフィーで調べると、45分後には出発材料は該混合物中に残っていなかった。該溶液を室温まで冷却するよ

うにし、残渣が粘稠になるまで溶媒留去し、該残渣を酢酸エチルで抽出、硫酸ナトリウムで乾燥、沪過した後溶媒留去した。生成物をシリカゲル上のクロマトグラフィーにかけ、ジクロロメタン：アセトン(1:1)で溶出して1-(ピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン820mg(66%)を淡黄色の油として得た：UV  $\lambda_{\text{max}}$  ( $\epsilon$ ) 234 nm(7.0 mM<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>)；NMR  $\delta$  3.03(m, 4H), 3.38(m, 4H), 4.06(s, 3H)；IR (film) 3318, 2945, 2854, 1447, 1364, 1286, 1230, 1046, 1004 cm<sup>-1</sup>；MS m/z(相対強度, %), 160(M<sup>+</sup>, 2), 145(7),

14(10), 115(9), 85(56), 58(7), 56(100);  $C_5H_{12}N_4O_2$  の計算される正確な質量 ( $M^+$ ) 160.0960, 実測値 160.0966。

ジクロロメタン: アセトニトリル (1 : 1) 10 ml 中の N-アセチル-L-メチオニン 1.64 mg (0.856 mmol) の溶液に、ジシクロヘキシリカルボジイミド (DCC) 2.06 mg (1 mmol) を加え、次いでジクロロメタン 3 ml 中の 1-(ビペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼン 1.37 mg (0.856 mmol) をすばやく導入した。該反応混合物を 25 °C にて 4 時間攪拌した。氷酢酸を数滴加えて過剰の DCC を分解した。該混合物を沪過し、溶媒留去した。残渣を酢酸エチルで抽出し、次いでそれを希塩酸で、その後希水酸化ナトリウム水溶液で洗浄した。有機層を硫酸ナトリウムで乾燥、硫酸マグネシウム層を通して沪過し、減圧下で溶媒留去した。1-(4-[N-アセチル]-L-メチオニルピペラジン-1-イル)-1-オキソ-2-メトキシジアゼンの精製は、アセトニトリル: テトラヒドロフラン (4 : 1) を溶出液として用いてシリカゲル上で達成された: UV  $\lambda_{max}$  ( $\epsilon$ ) 230 nm ( $8.7 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ); NMR  $\delta$  2.02(s, 3H), 2.07(m, 2H), 2.11(s, 3H), 3.46(m, 4H), 3.83(m, 4H), 4.03(s, 3H), 5.15(m, 1H), 6.28(b, 0.5H), 6.35(b, 0.5H), IR 3297, 2931, 2847, 1645, 1546, 1497, 1441, 1223 cm<sup>-1</sup>; MS m/z(相対強度, %), 333( $M^+$ , 4), 318(2), 304(3), 303(16), 288(12), 260(11), 259(100), 258(9), 214(78), 184(37), 183(10), 174(5), 146(26), 142(56), 141(5), 104(63), 61(60);  $C_{12}H_{23}N_5O_4S$  の計算される正確な質量 ( $M^+$ ) 333.1470,

実測値 333.1471。

ここに挙げた刊行物、特許、および特許出願は、各個々の文書が言及によって組み込まれるために個々にそして具体的に述べられ、ここに完全に明らかにされたと同程度に、ここに言及することで組み入れられるものである。

本発明を、好ましい実施態様を強調して説明してきたが、当業者には好ましい実施態様が変更され得ることが自明であろう。本発明はここで特別に記載された以外の方法でも実施され得ることが意図される。従って、本発明は添付の請求の範囲の精神と範囲に包含されるすべての変形を含むものである。

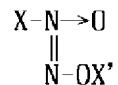
【手続補正書】特許法第184条の8第1項

【提出日】1996年11月20日

【補正内容】

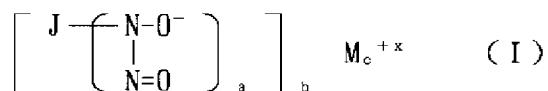
#### 請求の範囲

1. 生体高分子および該生体高分子に結合した酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基とを含有する、生理学的条件下での酸化窒素放出が可能な高分子組成物。
2. 該生体高分子が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、および核酸からなる群より選択される請求の範囲第1項の高分子組成物。
3. 該生体高分子が、組織、細胞、あるいは腫瘍特異的な抗体またはその断片、腫瘍細胞接着に好適な受容体ーリガンド相互作用の認識配列を有するタンパク質、抗走化性剤およびホルモンからなる群より選択される請求の範囲第2項の高分子組成物。
4. 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



(式中、Xは有機または無機部位であり、X'はX、医薬的に許容しうる金属中心あるいは医薬的に許容しうるカチオンからなる群より選択される)であり、該 $N_2O_2^-$ 基がXあるいはX'の少なくとも一方を介して生体高分子に結合している請求の範囲第1項の高分子組成物。

5. 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：

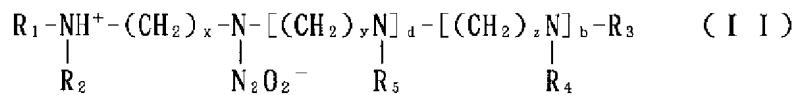


(式中、Jは有機または無機部位であり、 $M_c^{+x}$ は医薬上許容されるカチオン(式中、xはカチオンの原子価である)であり、aは少なくとも1の整数であり、bおよびcは中性化合物を与える最も小さい整数である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

6. Jが、炭素原子以外の原子を介して複合体の残りの部分の窒素に結合している請求の範囲第5項の方法。

7. 該酸化窒素放出基がアラノシンあるいはドパスチンの塩以外の化合物である請求の範囲第5項の高分子組成物。

8. 該酸化窒素放出  $\text{N}_2\text{O}_2^-$  官能基が式：

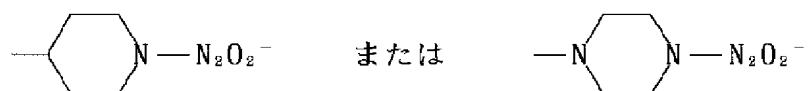


(式中、bおよびdは同一または異なって0または1であり、 $\text{R}_1$ 、 $\text{R}_2$ 、 $\text{R}_3$ 、 $\text{R}_4$ および $\text{R}_5$ は同一または異なって水素、 $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル、 $\text{C}_{1-12}$ 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、x、yおよびzは同一または異なって2~12の整数である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

9. 該酸化窒素放出  $\text{N}_2\text{O}_2^-$  官能基が式：

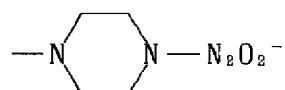


(式中、Bは



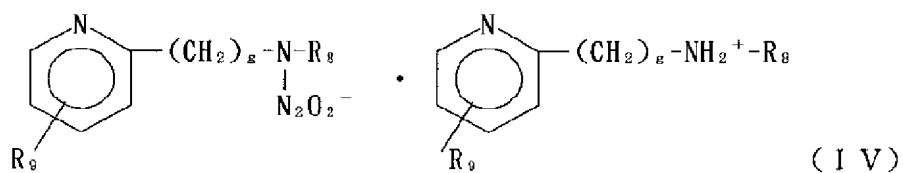
であり、 $\text{R}_6$ および $\text{R}_7$ は同一または異なって水素、 $\text{C}_{3-8}$ シクロアルキル、 $\text{C}_{1-12}$ 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、

トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、fは0~12の整数であり、ただしBが置換されたピペラジン部位



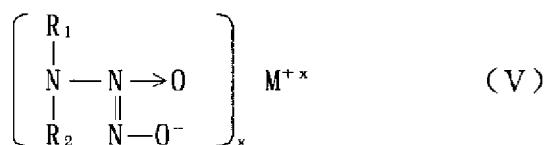
の場合、fは2~12の整数である。)である請求の範囲第1項に記載の高分子組成物。

10. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式：



(式中、 $R_9$ は水素、 $C_{3-8}$ シクロアルキル、 $C_{1-12}$ 直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2,2,2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、 $R_9$ は水素または $C_{1-C_{12}}$ 直鎖または分枝鎖アルキルであり、 $g$ は2~6である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

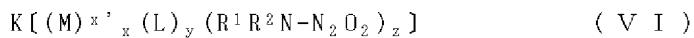
11. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式：



(式中、 $R_1$ および $R_2$ は独立して $C_{1-C_{12}}$ 直鎖または分枝鎖アルキル基およびベンジル基からなる群より選ばれ、あるいは $R_1$ および $R_2$ が窒素原子と共に

結合して、複素環基、ピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を形成し、 $M^{+*}$ は医薬上許容されるカチオンであり、 $x$ はカチオンの原子価である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

12. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式：



(式中、 $M$ は医薬上許容される金属、または $x$ が少なくとも2の場合、異なる2種の医薬上許容される金属の混合物であり、 $L$ は( $R^1 R^2 N - N_2 O_2$ )とは異なる配位子であり、少なくとも1つの金属に結合しており、 $R^1$ および $R^2$ はそれぞれ有機部位であり、それらは同一または異なっていてよく、 $x$ は1~10の整数であり、 $x'$ は金属 $M$ の形式的な酸化状態を示し、1~6の整数であり、 $y$ は1~18の整数であり、ただし、 $y$ が少なくとも2の場合、配位子 $L$ は同一または

異なっていてもよく、 $z$ は1～20の整数であり、Kは化合物を必要な程度まで中性にする医薬上許容される対イオンである。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

13. 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



(式中、RはC<sub>2-8</sub>低級アルキル、フェニル、ベンジルまたはC<sub>3-8</sub>シクロアルキルであり、R基のいかなるものも1～3個の置換基で置換されていてもよく、その置換基は同一または異なる群より選ばれ、Xは医薬上許容されるカチオン、医薬上許容される金属中心、またはC<sub>1-8</sub>低級アルキル、-C(O)CH<sub>3</sub>および-C(O)NH<sub>2</sub>からなる群より選ばれる医薬上許容される有機基であり、yは1～3の整数であり、

Xの原子価と一致する。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

14. 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式：



(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は独立して、C<sub>1-12</sub>直鎖アルキル、アルコキシまたはアシルオキシで置換されたC<sub>1-12</sub>直鎖アルキル、ヒドロキシまたはハロゲン置換されたC<sub>2-12</sub>直鎖アルキル、C<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、ヒドロキシ、ハロゲン、アルコキシまたはアシルオキシで置換されたC<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはヒドロキシ、アルコキシ、アシルオキシ、ハロゲンまたはベンジルで置換されているC<sub>3-12</sub>直鎖または分枝鎖オレフィンから選ばれるか、あるいはR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>がそれらが結合している窒素原子と共に複素環基、ピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を形成し、R<sub>3</sub>は、置換されていないか、またはヒドロキシ、ハロゲン、アシルオキシまたはアルコキシで置換されているC<sub>1-12</sub>直鎖およびC<sub>3-12</sub>分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはハロゲン、アルコキシ、アシルオキシまたはヒドロキシで置換されているC<sub>2-12</sub>直鎖またはC<sub>3-12</sub>分枝鎖オレフィン、置換されていないかまたは置換されているC<sub>1-12</sub>

アシル、スルホニルおよびカルボキサミドから選ばれる基、あるいはR<sub>3</sub>は式一  
 $(C H_2)_n - O N = N (O) N R_1 R_2$  (式中、nは2~8の整数であり、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は上記に定義した通り)であり、ただし、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>およびR<sub>3</sub>はヘテロ原子のαにハロゲンまたはヒドロキシ置換基を含まない。]である請求の範囲第1項の高分子組成物。

15. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第1項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

16. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第2項の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

【手続補正書】

【提出日】1997年10月9日

【補正内容】

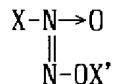
請求の範囲

1. 生体高分子および該生体高分子に結合した酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基とを含有する、生理学的条件下での酸化窒素放出が可能な高分子組成物。

2. 該生体高分子が、ペプチド、ポリペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、および核酸からなる群より選択される請求の範囲第1項の高分子組成物。

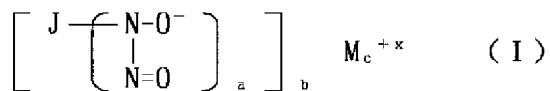
3. 該生体高分子が、組織、細胞、あるいは腫瘍特異的な抗体またはその断片、腫瘍細胞接着に好適な受容体-リガンド相互作用の認識配列を有するタンパク質、抗走化性剤およびホルモンからなる群より選択される請求の範囲第2項の高分子組成物。

4. 該酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が式：



(式中、Xは有機または無機部位であり、X'はX、医薬的に許容しうる金属中心あるいは医薬的に許容しうるカチオンからなる群より選択される)であり、該N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>基がXあるいはX'の少なくとも一方を介して生体高分子に結合している請求の範囲第1項の高分子組成物。

5. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式 :

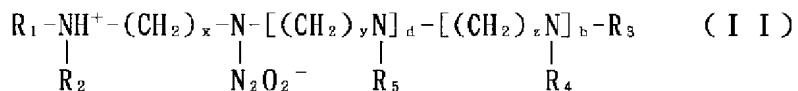


(式中、Jは有機または無機部位であり、 $M_c^{+x}$ は医薬上許容されるカチオン(式中、xはカチオンの原子価である)であり、aは少なくとも1の整数であり、bおよびcは中性化合物を与える最も小さい整数である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

6. Jが、炭素原子以外の原子を介して複合体の残りの部分の窒素に結合している請求の範囲第5項の方法。

7. 該酸化窒素放出基がアラノシンあるいはドパスチンの塩以外の化合物である請求の範囲第5項の高分子組成物。

8. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式 :

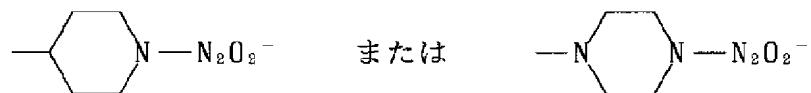


(式中、bおよびdは同一または異なって0または1であり、R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub>、R<sub>4</sub>およびR<sub>5</sub>は同一または異なって水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、x、yおよびzは同一または異なって2~12の整数である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

9. 該酸化窒素放出  $N_2O_2^-$  官能基が式 :

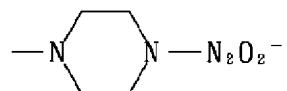


(式中、Bは



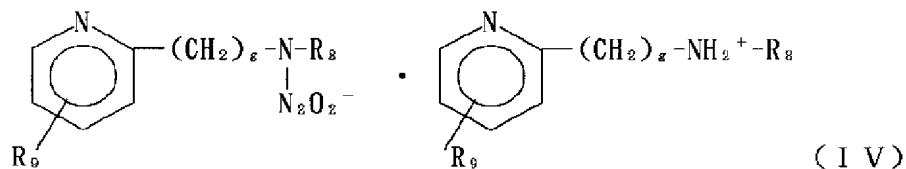
であり、R<sub>6</sub>およびR<sub>7</sub>は同一または異なって水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、

C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、fは0～12の整数であり、ただしBが置換されたピペラジン部位



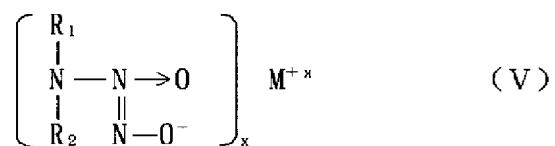
の場合、fは2～12の整数である。)である請求の範囲第1項に記載の高分子組成物。

10. 該酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が式：



(式中、R<sub>8</sub>は水素、C<sub>3-8</sub>シクロアルキル、C<sub>1-12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル、ベンジル、ベンゾイル、フタロイル、アセチル、トリフルオロアセチル、p-トルイル、t-ブトキシカルボニルまたは2, 2, 2-トリクロロ-t-ブトキシカルボニルであり、R<sub>9</sub>は水素またはC<sub>1-C12</sub>直鎖または分枝鎖アルキルであり、gは2～6である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

11. 該酸化窒素放出N<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>-</sup>官能基が式：

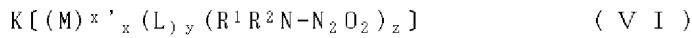


(式中、R<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>は独立してC<sub>1-C12</sub>直鎖または分枝鎖アルキル基およ

びベンジル基からなる群より選ばれ、あるいはR<sub>1</sub>およびR<sub>2</sub>が窒素原子と共に結合して、複素環基、ピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を

形成し、 $M^{+x}$ は医薬上許容されるカチオンであり、 $x$ はカチオンの原子価である。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

1 2 . 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式 :



(式中、 $M$ は医薬上許容される金属、または $x$ が少なくとも2の場合、異なる2種の医薬上許容される金属の混合物であり、 $L$ は( $R^1R^2N-N_2O_2$ )とは異なる配位子であり、少なくとも1つの金属に結合しており、 $R^1$ および $R^2$ はそれぞれ有機部位であり、それらは同一または異なっていてよく、 $x$ は1~10の整数であり、 $x'$ は金属 $M$ の形式的な酸化状態を示し、1~6の整数であり、 $y$ は1~18の整数であり、ただし、 $y$ が少なくとも2の場合、配位子 $L$ は同一または異なっていてもよく、 $z$ は1~20の整数であり、 $K$ は化合物を必要な程度まで中性にする医薬上許容される対イオンである。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

1 3 . 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式 :



(式中、 $R$ は $C_{2-8}$ 低級アルキル、フェニル、ベンジルまたは $C_{3-8}$ シクロアルキルであり、 $R$ 基のいかなるものも1~3個の置換基で置換されていてもよく、その置換基は同一または異なっていて、ハロゲン、ヒドロキシ、 $C_{1-8}$ アルコキシ、 $-NH_2$ 、 $-C(O)NH_2$ 、 $-CH(O)$ 、 $-C(O)OH$ および $-NO_2$ からなる群より選ばれ、 $X$ は医薬上許容されるカチオン、医薬上許容される金属中心、または $C_{1-8}$ 低級アルキル、 $-C(O)CH_3$ および $-C(O)NH_2$ か

らなる群より選ばれる医薬上許容される有機基であり、 $y$ は1~3の整数であり、 $X$ の原子価と一致する。)である請求の範囲第1項の高分子組成物。

1 4 . 該酸化窒素放出 $N_2O_2^-$ 官能基が式 :



(式中、 $R_1$ および $R_2$ は独立して、 $C_{1-12}$ 直鎖アルキル、アルコキシまたはアシルオキシで置換された $C_{1-12}$ 直鎖アルキル、ヒドロキシまたはハロゲン置換され

た  $C_{2-12}$  直鎖アルキル、 $C_{3-12}$  分枝鎖アルキル、ヒドロキシ、ハロゲン、アルコキシまたはアシルオキシで置換された  $C_{3-12}$  分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはヒドロキシ、アルコキシ、アシルオキシ、ハロゲンまたはベンジルで置換されている  $C_{3-12}$  鎮または分枝鎖オレフィンから選ばれるか、あるいは  $R_1$  および  $R_2$  がそれらが結合している窒素原子と共に複素環基、ピロリジノ、ピペリジノ、ピペラジノまたはモルホリノ基を形成し、 $R_3$  は、置換されていないか、またはヒドロキシ、ハロゲン、アシルオキシまたはアルコキシで置換されている  $C_{1-12}$  直鎖および  $C_{3-12}$  分枝鎖アルキル、置換されていないか、またはハロゲン、アルコキシ、アシルオキシまたはヒドロキシで置換されている  $C_{2-12}$  直鎖または  $C_{3-12}$  分枝鎖オレフィン、置換されていないかまたは置換されている  $C_{1-12}$  アシル、スルホニルおよびカルボキサミドから選ばれる基、あるいは  $R_3$  は式—  
 $(C H_2)_n - O N = N (O) N R_1 R_2$  (式中、 $n$  は 2 ~ 8 の整数であり、 $R_1$  および  $R_2$  は上記に定義した通り) であり、ただし、 $R_1$ 、 $R_2$  および  $R_3$  はヘテロ原子の  $\alpha$  にハロゲンまたはヒドロキシ置換基を含まない。] である請求の範囲第 1 項の高分子組成物。

15. 医薬上許容しうる担体と請求の範囲第 1 項～第 12 項のいずれかに記載の高分子組成物とを含有する医薬組成物。

16. 治療有効量の酸化窒素を放出するに十分な量の請求の範囲第 1 項～第 12 項のいずれかに記載の高分子組成物を含む、酸化窒素の投与が治療となる、哺乳類の生物学的障害の治療薬剤。

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.  
PCT/US 95/15180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 6 A61K31/785 A61K47/42

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 6 A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,95 24908 (THE SECRETARY,DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES,U.S.A.) 21 September 1995 see claims -----	1-38

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex

## \* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the international filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- \*&\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 March 1996

Date of mailing of the international search report

02.04.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax. (-31-70) 340-3016

Authorized officer

Scarpioni, U

<p style="text-align: center;"><b>INTERNATIONAL SEARCH REPORT</b></p>	International application No. <b>PCT/US95/15180</b>
<b>Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)</b>	
<p>This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input checked="" type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely: <b>Remark: Although claims 27-38 are directed to a method of treatment of the human/animal body by therapy (Rule 39.1 (iv) PCT), the search has been carried out and based on the alleged effects of the composition.</b></li> <li>2. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:</li> <li>3. <input type="checkbox"/> Claims Nos.: because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).</li> </ol>	
<b>Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)</b>	
<p>This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <input type="checkbox"/> As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.</li> <li>2. <input type="checkbox"/> As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.</li> <li>3. <input type="checkbox"/> As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:</li> <li>4. <input type="checkbox"/> No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:</li> </ol>	
<p><b>Remark on Protest</b></p> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.       </div>	

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

#### Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 95/15180

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9524908	21-09-95	AU-B- 1988995	03-10-95

フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	F I	
C 0 7 H	21/04	C 0 7 H	21/04
C 0 7 K	1/107	C 0 7 K	1/107
	5/062		5/062
	5/097		5/097

(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, DE,  
DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG,  
, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN,  
TD, TG), AP(KE, LS, MW, SD, SZ, U  
G), AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, C  
A, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI  
, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP,  
KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG,  
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO  
, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM,  
TT, UA, UG, UZ, VN

(72) 発明者 ローラー、ピーター ピー。  
アメリカ合衆国、メリーランド州 20852  
ロックヴィル、ヴィレッジ スクウェア  
テラス、12403、アパートメント 301  
(72) 発明者 アカマツ、ミキ  
アメリカ合衆国、メリーランド州 20852  
ロックヴィル、コングレッショナル レー  
ン、263、アパートメント 410